ハイパーサーミアおよび血管作動性薬剤併用時における局所血流量の変化

長谷川　武夫[1),2)]，久高　亮[1)]，斎藤　一樹[1)]，古宇田　誉[1)]，大石　有輔[1)]，
石底　真紀[1)]，小野　博史[2)]，大野　由紀子[2)]，天野　守計[2)]

[1)]鈴鹿医療科学大学　保健衛生学部　放射線技術科学科
[2)]鈴鹿医療科学大学大学院　保健衛生学研究科　医療画像情報学専攻

1．はじめに

現在，癌の治療法においては，外科的手術，放射線療法，化学療法，温熱療法，免疫療法等があり，臨床ではこれらを併用して行われている。これらの治療法の中で温熱療法は比較的新しい治療法として悪性腫瘍の治療に応用され，良好な成績が報告されている[1)]。

温熱療法とは，熱のみによって癌を治療するもので癌の部分を 42.5°C以上にあげて，加温だけで癌を破壊する治療法であり，温熱治療，ハイパーサーミアとも呼ばれ，生体を比較的に低い温度（正常組織への影響がほとんどなく，火傷をしない 42～45°Cの温度）で温めて悪性腫瘍を治療する方法である[1)]。

ハイパーサーミアによる悪性腫瘍の治療の歴史は古く，紀元前にもさかのぼると言われ，19 世紀中頃に Coley 等によって学術的な報告としてなされたが，当時は加温方法，温度測定，副作用等が十分検討されずに放置されており，その後，放射線治療や化学療法などの急速な発展に比べ，忘れ去られていた。1960 年に入ってから，温熱治療の基礎研究が本格的に再開され，現在では，温熱装置の開発[2)]，非侵襲的温度測定[3)]，温熱による殺細胞効果[4)]，温度と放射線又は制癌剤との併用等の研究[5)] が意欲的に行われている。1975 年にワシントンで国際温熱シンポジウムが開催されて以来，悪性腫瘍の治療におけるハイパーサーミアの応用は着実に発展し，現在では主要な治療方法の一つとしてあげられている[6)]。

2．目的

ハイパーサーミアでは，加温された正常組織では血管の拡張が起こり，血流の増加によって冷却効果が起こるのに対して，腫瘍組織では血管拡張を起こしにくいため血流は流れやすい正常組織に流れ，腫瘍部血流は低下し，そのために冷却効果が起こらず，腫瘍組織の温度が上がりやすい。これにより正常組織に対して腫瘍組織は選択的に加温され，腫瘍の細胞死を強めている。したがって，ハイパーサーミアにおいて正常組織と腫瘍組織との血流量の差を大きくすることが重要である。

今回の研究では，各温度による血流量の変化，さらに血管作動性薬剤（ヒドララジン）と温熱を併用することによる血流量の変化を調べ，血管作動性薬剤と温熱とを併用することによる温熱効果への影響について検討した。

3．使用機器

・マウス（C 3 H/HeSlc）　日本エスエルシー♂ 6 週令
・レーザー血流計　ユニークメディカル　TBF-LC 1
・エレクトロニックレコーダー　理化電機　R-63 A
・ウォーターバスコントローラー　島津　SBAC-40
・ウォーターバスコントローラー　ヤマト科学 BF-21
・水中ポンプ　寺田ポンプ製作所　SL-52
・循環温水装置（自主製作）
・マウス固定用器具（自主製作）
・ヒドララジン　SIGMA　10 mg/kg
・ネンブタール　ダイナボット　50 mg/kg
・SCC Ⅶ腫瘍（1×10^6 個/0.05 ml 皮下移植）

4．実験方法

4.1　腫瘍細胞の培養と植え付け

⑴　冷凍保存細胞からの培養法

① 腫瘍細胞を含む冷凍チューブ（10%DMSO＋30% FBS＋60%MEM）内の液体を 37℃で急速解凍する。
② 解凍した細胞を 10 mlMEM 入りの 10〜15 ml 遠心管に無菌状態で移す。
③ 時間が経過すると DMSO の毒性により細胞が死亡し，遠心管内に浮遊するので迅速に作業する。
④ 細胞浮遊液を 1200 RPM にて 5 分間遠心する。
⑤ 細胞は沈下して遠心管の底にペレットを作る。
⑥ 遠心管の底の細胞を吸い出さぬように，遠心管を傾けて加熱滅菌した針で上澄み液を吸引し，除去。
⑦ 新たに無菌の 10%FBS＋90%MEM 液を約 10 ml 加えて攪拌し，洗浄する。
⑧ シャーレに約 10 ml の 10%FBS と 90%MEM 液を加え，この中に⑦の浮遊細胞を液ごと滅菌パスツールピペットで 0.5〜1 ml まきつける。
⑨ 2〜3 日後に細胞がシャーレの底に付着していることを顕微鏡で確認し，シャーレ内の液を無菌操作にて除去し，新しく培地（10%FBS＋90% MEM）を加える。
⑩ コンフルエンス状態（細胞が密着した状態）になったら実験に使用する。

⑵　シャーレから細胞をはがす方法

① シャーレ中の培地を加熱滅菌した針にて吸引し除去。（腫瘍細胞はシャーレの底に付着している）
② 無菌 PBS（Mg，Ca 無し：CMF-PBS）を 10 ml 加え，4〜5 分間放置し洗浄する。
③ 洗浄後の CMF-PBS 液を加熱滅菌した針にて吸引し除去する。
④ 0.025%トリプシン液（無菌）を 2〜3 ml 加えて 2〜3 分間放置（シャーレに付着している腫瘍細胞を剝離可能にする）。
⑤ 顕微鏡により細胞が丸くなったことを確認する。
⑥ 無菌パスツールピペットにより，シャーレ中のトリプシン液を使い底に付着している細胞に軽く噴射して付着細胞を剝がす。
⑦ 剝がした細胞を 10 mlMEM 入りの遠心管に加えトリプシンを希釈して，トリプシンの作用を抑える。
⑧ 1200 RPM にて 5 分間遠心し，細胞とトリプシンを分離する。
⑨ トリプシンと MEM を含む上澄み液を無菌パスツールピペットにより吸引し除去し，目的の細胞のみを残す。
⑩ 沈殿した細胞が入っている遠心管に 4〜5 ml の 10%FBS＋90%MEM を加え攪拌する。
⑪ ⑩から 100〜200 μl 採取してセルカウントする。

⑶　セルカウント法

① 上述⑩の細胞浮遊液をエッペンチューブに 100〜200 μl 採取する。
② 別のエッペンチューブに，4.25%NaCl と 0.2%トリパンブルーを 1：4 の割合で混合する。
③ 細胞浮遊液からよく攪拌した細胞液を 100 μl エッペンチューブに加える。

④　4.25％NaCl と 0.2％トリパンブルーを 1：4 で混合した液を 100 μl 採取して③に混合する。

⑤　よく攪拌させて血球計算盤にて計数し，0.05 ml 中に 5×10⁵個の細胞数になるように細胞液を調整した。

⑷　腫瘍細胞の移植

日本エスエルシーより購入したマウスを正常組織測定用と腫瘍組織測定用の二群に分けて一週間の予備飼育を行った後，腫瘍組織測定用マウスの右大腿部皮下に 0.05 ml づつ 26 G 針を用いて皮下移植を行った。腫瘍サイズが 5×5 mm となったところで血流量の測定を開始した。

4.2　血流量測定

マウスへ麻酔剤としてネンブタールを 1 ml 注射器に接続した翼状針より，50 mg/kg(原液を 1/10 希釈した液を 30 g 体重/0.3 cc）腹腔内投与を行い眠らせた。

麻酔剤によりマウスを眠らせた後，アクリルの固定具にマウスをくぐらせて腰，尾，右足をテープで固定しマウスが動けない状態にした後，循環温水装置に設置し，レーザー血流計のプローブを右足大腿部の正常皮下組織部表面および腫瘍組織部表面へ軽く接触させた。血流計に接続されたエレクトロニックレコーダー（記録計）のペーパー速度を 1 cm/min とし，血流量の経時的変化を測定した。

4.3　温水による温熱処理

温熱処理に用いる温水は 2 つのウォーターバスコントローラー（加温器）により加温水槽中で設定した温熱処理温度に保った。ウォーターバスコントローラーによる温水の加温時に起こる振動をレーザー血流計のプローブへ与えないために，水中ポンプによって加温水槽から実際にマウスの温熱処理を行う循環温水装置へ温水を循環させた。

温熱処理は，循環温水装置の排水部のアクリル板を上下させることにより温水面の高さを変え，固定具に固定されたマウスの右大腿部のみを温水に浸して行った。

温熱処理はマウスの右大腿部の血流が約 5 分間安定したところで開始し，加温温度は 40～44℃で，温熱時間 20 分とした。

4.4　温熱処理と血管拡張剤（ヒドララジン）との併用

使用した血管作動性薬剤は塩酸ヒドララジン（Hydralazine Hydrochloride），化学名は Phthalazin-1-ylhydrazine monohydrochloride（$C_8H_8N_4$・HCl），分子量は 196.64，性状は白色の結晶性の粉末でにおいはなく，味は苦い[8)]。

薬理作用の昇圧作用機序については，まだ十分に解明されていないが，末梢細動脈の血管平滑筋に直接作用し，血管を拡張することが主作用であると考えられる。ヒドララジンによる心拍数・心拍出量の増加は血管抵抗減少に伴う反射性の交換神経緊張によるものと考えられている[8)]。これらの心刺激作用は β-アドレナリン受容体遮断剤により抑制される。また腎・脳血流量に関しては血管抵抗の減少とともに維持又は増加させる。

禁忌としては虚血性心疾患のある患者。大動脈弁狭窄，僧帽弁狭窄及び拡張不全による心不全のある患者。高度の頻脈及び高心拍出性心不全のある患者。肺高血圧症による右心不全のある患者。解離性大動脈瘤のある患者。頭蓋内出血急性期の患者。薬物過敏症患者などがあげられる[8)]。

副作用としては SLE 様症状（発熱，紅斑，関節痛，胸部痛等），うっ血性心不全，狭心症発作誘発，麻痺性イレウス，呼吸困難，急性腎不全，溶血性貧血，汎血球減少，多発性神経炎，血管炎，劇症肝炎などが現れる[8)]。

温熱処理と血管作用物質の併用では，加温温度 42℃で，温熱開始 10 分後にヒドララジンを 1 ml 注射器に接続した翼状針より，10 mg/kg 腹腔内投与し，その 10 分後に温熱を終了した。合計の温熱時間は温熱処理のみと同様に 20 分間とした。
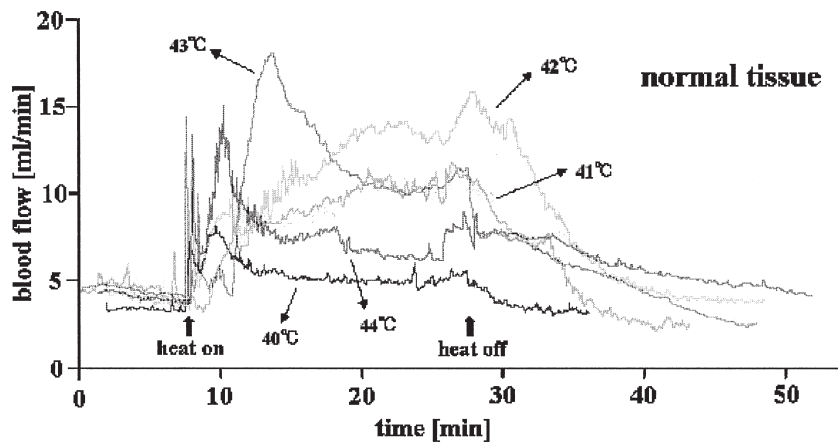
図1　正常組織における温熱処理による血流量の変化
横軸は時間，縦軸は血流量を示す。heat on の矢印で温熱を開始し，heat off の矢印で温熱を終了した。正常組織の血流量の変化については 40～42°C までは加温温度に伴って血流の上昇がみられ，43°C以上では温熱直後急激な血流上昇の後血流量の低下がみられた。

5．結果

5.1　温熱処理による血流量の変化

正常組織における温熱処理による血流量の変化を図1に示す。

温熱前の正常組織の血流量は 3.3～4.4 ml/min であった。

温熱を開始して約 10 分後には加温温度 40°Cで 5.3 ml/min，41°Cで 10.3 ml/min，42°Cで 13.4 ml/min の値で血流量が安定した。

加温温度 43°Cと 44°Cでは，温熱開始約 5 分後に最大 18.1 ml/min，13.0 ml/min と急激な血流量上昇後，血流量が低下し温熱 10 分後には 10.5 ml/min，6.5 ml/min の値で安定した。

正常組織における温熱処理では 42°C加温での血流量の増加が最も良く，42°C以下での加温では，加温温度が低くなるにつれ血流量増加は少なくなっていた。42°C以上の加温では，温熱開始から急激な血流量上昇がみられたが，その後，血流量の低下が起こり 42°C加温での血流量より低くなった。

腫瘍組織における温熱処理による血流量の変化を図2に示す。

温熱前の腫瘍組織の血流量は 1.6～2.4 ml/min であった。

温熱を開始して約 10 分後には加温温度 40°Cで 2.3 ml/min，41°Cで 3.6 ml/min，42°Cで 6.6 ml/min，43°Cで 9.6 ml/min の値で血流量が安定した。

加温温度 44°Cでは温熱開始直後から急激な血流量上昇の後に低下し温熱 10 分後には 3.0 ml/min の値で安定した。

腫瘍組織における温熱処理では 43°C加温での血流量の増加が最も多く，次いで 42°C加温となった。40，41，44°C加温での血流量の増加は少なく，40，41 加温では僅かな血流量の増加しかみられなかった。

正常組織と腫瘍組織の血流量の変化を比べてみると，温熱によって血流量の差が最も大きくなったのは 42°C加温のときであった。

5.2　温熱処理と血管拡張剤（ヒドララジン）との併用による血流量の変化

温熱処理とヒドララジンとの併用による正常組織および腫瘍組織の血流量の変化としては，正常組織では，温熱前 3.7 ml/min の血流が温熱開始後 14.1 ml/min まで増加し，ヒドララジン投与後更に 20.9 ml/min まで増加したが，温熱終了時には 15.2 ml/min となっ
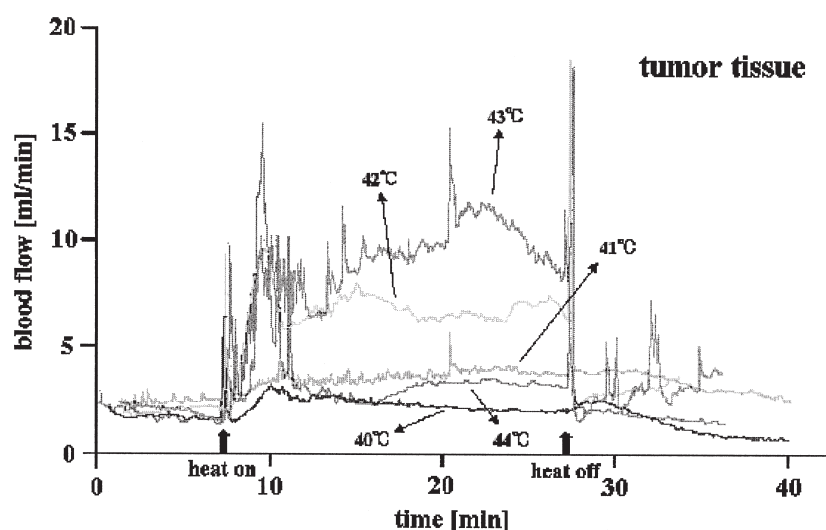
図２　腫瘍組織における温熱処理による血流量の変化
横軸は時間，縦軸は血流量を示す。heat on の矢印で温熱を開始し，heat off の矢印で温熱を終了した。腫瘍組織の血流量は 42，43℃加温において上昇がみられたが，その他の温度においては，わずかな血流上昇しかみられず，44℃加温においては正常組織同様，急激な血流上昇の後血流量の低下がみられた。

た。

腫瘍組織では，温熱前 2.3 ml/min の血流が温熱開始後 6.8 ml/min まで増加し，ヒドララジン投与後約５分で 4.5 ml/min と低下した。

42℃における加温では正常組織および腫瘍組織ともに血流上昇がみとめられ両者の血流量の差は 7.3 ml/min となった。温熱 10 分後にヒドララジン（10 mg/kg）を投与すると正常組織では血流の上昇がみとめられたのに対し，腫瘍組織では血流の低下がみとめられ，血流量の差は投与数分後では 16.4 ml/min，投与 10 分後に 10.7 ml/min と，温熱のみの時より血流量の差は大きくなった。

６．考察

測定結果より，正常組織は腫瘍組織に比べて血流は高いが，温熱を行うと腫瘍組織の血流量は正常組織と比べあまり増加しなかった。このことにより腫瘍組織は正常組織に比べ，低血流による熱拡散能の低下のため組織内が高温となり，血管損傷により酸素分圧低下から低 pH になると考えられ，腫瘍組織に対する温熱効果が期待できると考えられる。しかし，42℃以上の加温では，温熱開始から急激な血流量上昇がみられたが，その後，血流量の低下が起こった。これは加温が高温度になると，腫瘍組織内の血管の圧縮，閉塞，出血および血流停止性血栓が生じ，そのために血流の低下が起こる[7] と考えられる。

本実験では血管拡張剤（ヒドララジン：10 mg/kg 腹腔内投与）によって正常部組織は神経支配を受け，血流または，血流低下が抑制される[9]。しかし，腫瘍組織は正常組織に流れた分だけ腫瘍組織の血流は低下するため，熱拡散能の低下による組織内の高温化と，低血流による血中酸素分圧低下からくる嫌気性解糖によって腫瘍組織を低 pH 状態にすることで酸ホスファターゼ活性が高められ，熱による損傷の回復が阻害され，細胞死が促進され，温熱効果が増強すると考えられる[1]。

本研究の結果ではヒドララジン投与によって正常組織の血流は増加し，腫瘍組織の血流が低下を示した。このことは温熱治療にとって好条件が整ったことを示している。しかし，ヒドララジン投与によって正常組織の血流が増加し，腫瘍組織は低血流が維持されたことは温熱治療には好条件であっても，放射線治療に

とっては低酸素のための放射線効果の減少が考えられる。また，低血流状態は薬剤到達度を低下させるため，化学療法も効果の減少が考えられる。

今後の課題としては，ヒドララジンと温熱の併用時およびヒドララジンと放射線の併用時における抗腫瘍効果の測定を行い，ヒドララジン投与による腫瘍組織の低血流からなる低酸素状態が放射線治療の治療効果に影響を及ぼすか測定して，ヒドララジンの温熱治療，放射線治療の適用性並びに，化学療法への影響を検討していく必要がある。

7．結論

1）腫瘍組織は正常組織に比べて温熱による血流の上昇は低かった。
2）ヒドララジン投与によって温熱単独時処理よりも温熱効果の好条件が組織内に整った。
3）ヒドララジン併用による温熱効果の増強があることが示された。

参考文献

1）松田忠義，菅原努，安倍光幸，他編集：難治癌への挑戦，ハイパーサーミアの臨床，pp 33～351，医療科学社
2）加藤博和，石田哲也：我が国で使用されている加温機器；アプリケータのSAR分布について．日本ハイパーサーミア学会誌．第10巻，第1号，pp 19～33，1994
3）長谷川武夫，石黒ヨハネ，山本五郎，徐志堅，永田憲司，バレンチナ・オスタペコン，田中敬正：被加温体周辺の電磁波電流測定による被侵襲的モニター（2次元温度分布表示への応用），日本ハイパーサーミア学会誌．第10巻，第3号，pp 297，1994
4）田中敬正，長谷川武夫，大嶋太一：温熱による生理学的変化（特に腫瘍の微小循環器系を中心に）．消化器癌．第2巻，第3号，pp 227～232，1992
5）T. Hasegawa, Y. Ishiguro, T. Oshima, Y. Tanaka : Potentiation of Using Hydralazine, Jpn. J. Hyperthermic Oncology, Vol. 11, No. 1, pp 29～33, 1995
6）松田忠義：電磁波温熱療法健保採用の経緯と今後の課題．日本ハイパーサーミア誌．7：92～96，1991
7）Deway, W. C., Hopowood, L. E., Sapareto, L. A., et al : Cellular responses to combinations of hyperthermia and radiation. Radiology, 123, 463～474, 1977.
8）ノバルティスファーマ株式会社取扱説明書．注射用アプレゾリン（注射用塩酸ヒドララジン），pp 1～2
9）長谷川武夫　他：組織内pH値の温熱感受性及び温熱耐性への影響，（in Vivoにおける検討），日本ハイパーサーミア学会誌，4巻，4号，279～287（1988）

Change of the amount of blood flows when combined with a Hyperthermia and vasoactive drug

Takeo HASEGAWA[1),2)], Ryo KUDAKA[1)], Kazuki SAITO[1)], Takashi KOUDA[1)], Yusuke ISHISOKO[1)], Hirobumi ONO[2)], Yukiko OHNO[2)], Morikazu AMANO[2)]

[1)]Department of Radiological Technology, Faculty of Health Science, Suzuka University of Medical Science

[2)]Division of Medical Imaging, Graduate School of Health Science, Suzuka University of Medical Science

Key Words: hyperthermia, vasoactive drug, blood flow

Abstract

We investigated change of the amount of blood flows by each temperature of heat treatment and change of the amount of blood flows by using a vasodilator (Hydralazine) and warm temperature together further, and the influence on the warm temperature effect by using together a blood vessel operation nature medicine and warm temperature was considered.

We measured the blood flow at the time of 40～44℃ warm temperature of subcutaneous tissue with the normal thigh of C3H mouse, and an SCC-VII tumor, and measured change of the blood flow in Hydralazine administration.

Although the blood flow of a normal tissue is higher than a measurement result compared with a tumor, if warm temperature is performed, it will go up further. However, if it becomes high temperature, the blood vessel in a normal tissue and a tumor tissue will be damaged, and it will be thought that the fall of a blood flow takes place.

The blood flow of a normal tissue increased by Hydralazine medication, and the blood flow of a tumor showed the decreased caused by decreased of blood flow in tumor tissue. These result shows that Hyperthermia can enhanced the heat damage to tumor tissue selectively.